

13

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-130601

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)7月12日

C 08 B 37/08  
A 61 L 29/00  
A 61 M 1/10

7133-4C  
6779-4C  
6675-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 ヒアルロン酸水不溶性組成物の製法

⑯ 特 願 昭59-162779

⑰ 出 願 昭59(1984)7月31日

優先権主張 ⑱ 1983年12月15日⑲ 米国(U S)⑳ 561818

㉑ 1984年4月9日㉒ 米国(U S)㉓ 598071

⑳ 発 明 者 エンドレ エー ボラ アメリカ合衆国、ニューヨーク 10463、リバーデイル、  
ーズ

㉑ 発 明 者 アドルフ レシシナー アメリカ合衆国、ニューヨーク 11218、ブルックリン、  
オーシャン・パークウェイ 245

㉒ 出 願 人 バイオマトリックス、 アメリカ合衆国、ニュージャージー 07657、リッジフイ  
インコーポレイテッド ールド、レールロード・アベニュー 65

㉓ 代 理 人 弁理士 野河 信太郎

# 明 細 書

## 1. 発明の名称

ヒアルロン酸水不溶性組成物の製法

## 2. 特許請求の範囲

1. ヒアルロン酸又はその塩を、ホルムアルデヒド、ジメチロール尿素、ジメチロールエタレン尿素、エタレンオキド、ポリアゾリジン、ポリイソシアネートおよびソビニルスルホンからなる群から選択された架橋剤との処理に付すことによる水不溶性のヒアルロン酸又はその塩の組成物の製法。
2. 架橋剤がホルムアルデヒドで、処理が水性媒体中還流温度で行われる特許請求の範囲1項による方法。
3. 架橋剤がポリアゾリジンで、処理が乾燥状態で室温で行われる特許請求の範囲1項による方法。
4. 架橋剤がポリイソシアネートで、処理がアセトン中還流温度で行われる特許請求の範囲1項による方法。
5. 架橋剤がジメチロールエタレン尿素で、処理

が約110℃で行われる特許請求の範囲1項による方法。

6. 架橋剤がソビニルスルホンで、処理が約60～65℃で行われる特許請求の範囲1項による方法。
7. 架橋剤がソビニルスルホンで、処理が約20℃でアルカリ条件下で行われる特許請求の範囲1項による方法。
8. ヒアルロン酸又はその塩が、粉末状、フィルム状又はゲル状の形で架橋されてなる特許請求の範囲1～7項の何れかの方法。

## 3. 発明の詳細な説明

この発明はヒアルロン酸又はその塩の生体適合性で水に不溶な組成物及びその製法に関する。この発明の組成物は、生体適合性であるので、人工心臓バルブや、導管移植片などを含む人工臓器のような各種の生体内用途に用いることができる。また、この発明の組成物は、各種の重合体製品の改質に用いることができ、この改質品は同様に各種生体内用途を有する。

ヒアルロン酸は、公知の天然物であつて、医師

や生物学で多くの用途が知られているもので(たとえば米国特許第4,272,522号及びその中の引用文献参照)、またヒアルロン酸のある種の架橋ゲルは公知である(ローレンら、Aota Chem. Soand. 18 1964 No1, p274~5)。

この発明によれば、ヒアルロン酸又はその塩をホルムアルデヒド、ジメチロール尿素、ジメチロールエチレン尿素、エチレンオキシド、ポリアクリジン、ポリイソシアネート及びジビニルスルホンからなる群より選択された架橋剤との処理に付すことからなる水不溶性ヒアルロン酸又はその塩の組成物の製法が提供される。

この発明におけるヒアルロン酸又はその塩は、市販品又はそれから誘導されたものが用いることができる。ヒアルロン酸の塩は、生体適合性であるかぎり、各種の公知の塩が含まれる。好ましい具体例としてナトリウム、カリウム、カルシウムなどの塩が含まれる。

ヒアルロン酸又はその塩は、架橋時に粉末状、フィルム状、ゲル状の何れであつてもよい。さら

に、支持材で支持されたものであつてもよい。支持材としては、たとえばポリエチレンテレフタレートのような合成樹脂の繊維のシートや、イオン交換樹脂、シリカ、アルミナのような粒状物であつてもよい。粉状物を例にとれば、粉状物を予めヒアルロン酸又はその塩で被覆し、得られる被覆粉状物をこの発明の架橋剤で架橋されてもよい。また、繊維のシートを支持材とする場合には、ヒアルロン酸又はその塩はフィルム状として支持されたものである。

この発明で使用する架橋剤は、前述のごとき特定のものであるが、架橋条件は架橋剤の種類によつて変えられる。処理は乾燥又は水性条件下、室温又は室温で行うことができる。その1例を挙げると架橋剤がジビニルスルホンの場合、架橋反応は乾燥状態で約60~65℃で加熱して行うことができるが、一方アルカリ性溶液中(室温例えば約20℃で行うことができる。ヒアルロン酸又はその塩は、熱に敏感であるのでなるべく低い温度の処理が好ましい。

より詳しい処理条件は、次に挙げる実施例によつて説明する。

次にこの発明の数量の具体例を実施例(特に明記しない限り、重量部)で例証するが、これによつてこの発明は限定されるものではない。

#### 実施例1

水-アセトン混合物に、37%(重量)ホルムアルデヒド水溶液と過塩酸を加えた。得られた混合物の組成(重量%)は、 $\text{CH}_2\text{O}$  0.27;  $\text{HClO}_4$  0.19; 水/アセトン比1:28であつた。ヒアルロン酸ナトリウム粉末(0.5g)を、この混合物50ml中で10分間加熱還流した。次いで粉末をろ取し、十分に水/アセトン1:5溶液で洗い、次いでアセトンで洗い、真空オーブン中で乾燥した。生成したヒアルロン酸粉末は、水に不溶で、結合した $\text{CH}_2\text{O}$ を1.41%含有した。

#### 実施例2

次の組成(重量%) :  $\text{CH}_2\text{O}$  2.5;  $\text{HClO}_4$  0.38; 水/アセトン比1:2の架橋溶液で、上記の実施例1を繰り返して行つた。生成物の $\text{CH}_2\text{O}$ 含量は5.3

%であつた。

実施例1と2で、ヒアルロン酸粉末の架橋は、水-アセトン溶液中で実施された。水/アセトン比とホルムアルデヒド濃度を変化させることにより、生成物の膨潤比(swelling ratio)を調整することが可能である。かくして、膨潤比は実施例1の生成物で178%で実施例2のものは250%であつた。膨潤比は溶液中のアセトン量とホルムアルデヒド濃度とを増加させることにより減少させることができる。

次の実施例は、架橋剤としてポリアクリジン化合物を使用する場合を例証する。このポリアクリジンタイプの化合物は、乾燥状態で室温でヒアルロン酸を架橋するが、室温で行うことはヒアルロン酸が熱に敏感なポリマーであるためヒアルロン酸の場合に特に重要である。

#### 実施例3

ヒアルロン酸の水溶液113.0g(濃度14.2g/ml)に、0.62gのポリアクリジン化合物-クロム-リンカーCX100(ポリビニルケミカル社製)

を加えた。架橋剤のヒアルロン酸に対するモル比は0.5であつた。混合物をガラス板で5mm厚さの層として、室温で2日間乾燥した。架橋ヒアルロン酸の透明フィルムが得られ、このものは水に溶解せず、かつ100%の水中の膨潤比を有した。

#### 実施例4

0.5gの乾燥ヒアルロン酸粉末を、クロスリンカーCX-100の1%アセトン液50mlと混合し、5分間保つた後、採取した。粉末を空气中で2時間乾燥し、次いで水で数回洗い、真空オーブン中40℃で4時間乾燥した。架橋粉末の水中の膨潤比は135%であつた。

次の実施例は、高次の膨潤性を有する架橋ヒアルロン酸を得るためポリアクリジン化合物を用いた場合を例証するものである。

#### 実施例5

固形のヒアルロン酸ナトリウム0.6gを、0.6%クロスリンカーCX-100の水溶液と混合した。得られた溶液はヒアルロン酸ナトリウムに対するCX-100のモル比=0.1を有した。溶液中のヒア

物をガラス板上にキャストし、一夜放置乾燥した。得られたフィルムを110℃で15分間加熱処理した。そのものは、水に不溶で、145%の膨潤比を示した。

次の実施例はヒアルロン酸を架橋するためにジビニルスルホンを用いた場合である。

#### 実施例8

0.401g (1ミリモル) のジビニルスルホン含有のヒアルロン酸ナトリウム溶液35mlにジビニルスルホン0.118g (1ミリモル) を混合した。混合物のpHを1%水酸化ナトリウム水溶液で約8.5〜9に調整した。混合物をガラス板にキャストし、一夜室温で乾燥して、フィルムを得た。このフィルムは水に易溶であつた。フィルムを80℃で30分間加熱して、強固な水に不溶なフィルムを得た。

#### 実施例9

非架橋ヒアルロン酸の乾燥フィルムを、20%のアセトンと13%の水との混液に0.6%のジビニルスルホンを溶解した液の中に入れ、10分間保持

ヒアルロン酸ナトリウム含量は0.04% (重量) であつた。得られた高粘稠性混合液のpHを2%塩酸で2.5に調整した。得られたフィルムは水に易溶性であつた。このフィルムを80℃で30分間加熱した。この加熱処理で強固な水不溶性のフィルムが得られた。

#### 実施例6

繊維様のヒアルロン酸ナトリウム (0.1093g) を1%ポリイソシアナート (モーベイ・ケミカル社製、デスモジユア N-75) のアセトン溶液25mlと混合し、混合物を10分間遊液した。沈降物を分離し、アセトンで3回洗浄し、45mm Hgの減圧下60℃で30分間乾燥し、最後に5%酸化銅入り減圧デシケーターで乾燥した。得られた生成物 (0.1127g) は水に不溶で、120%の膨潤比を有した。

#### 実施例7

ヒアルロン酸ナトリウム水溶液 (濃度9.8mg/ml) の6gを、0.017gのN,N-ジメチロールエチレン尿素及び0.005gの硫酸亜鉛と混合した。混合

した。溶液からフィルムを取り出し、空气中で10分間乾燥し、次いでオーブン中65℃で20分間加熱した。ヒアルロン酸の強固な架橋フィルムが得られた。

#### 実施例10

風乾ヒアルロン酸ナトリウム2.95gを0.2規定水酸化ナトリウム水溶液57.35gと混合し、完全に溶解するまでガラス棒で攪拌した。次いでジビニルスルホン1gをその混合物に混合攪拌し、室温で1時間放置した。混合物は、強いゲルとなつた。このゲルを100mlの水とともに、Vir-Tis "45" ホモゲナイザーに入れ、30,000 rpmで5分間処理した。非常に膨潤した小さな粒子が得られた。この粒子を水で数回洗浄し、ガラスロート上吸引採取した。膨潤率を測定するため、約1gのゲルを、15mlのガラスフィルターに入れ、次いでプラスチックの遠心管に入れ、3,000 rpmで30分間遠心分離した。圧出した水が遠心管の底に集められた。ゲル中のヒアルロン酸濃度は、0.81%で、即ち水中での膨潤比が476であつた。

実施例 11

実施例 10 に記載した手法でゲルを得、これを 0.15 モル食塩水に分散した。粒子を同じ食塩水で洗浄した。遠心分離後のゲル中のヒアルロン酸濃度は 1.2996 で、膨潤比は 77.5 であつた。

実施例 12

風乾ヒアルロン酸ナトリウム 1.0g を 0.2 モル水酸化ナトリウム水溶液 9.0g に溶解し、ガッス棒で攪拌した。得られた粘稠液に、ジビニルスルホン 0.33g を混合攪拌し、室温で 20 時間放置した。得られた硬いゲルを実施例 10 と同様に処理した。遠心分離後のゲル中のヒアルロン酸濃度は 4.3096 であり、即ち膨潤比が 23.6 であつた。

この結果による細胞の生体適合性は、下記のテスト法により例証される。

実施例 13 - 血液適合性テスト

実施例 10 によつて作られたサンプルの血液反応性を評価する予備研究に、 $^3\text{H}$ -セロトニンのヒト血小板による放出を用いた。正常ヒト静脈血をプラスナック・シリコンで採取し、直ちに 3.0

96 クエン酸ナトリウム含有のプラスナック・チューブに移した (9 部の全血に対し 1 部のクエン酸ナトリウム)。

血小板に富んだ血漿を、4℃で 125 XG で 15 分間遠心分離で作り、血漿用ピペットでプラスナック製又はシリコン化試験管に移した。血小板に富んだ血漿 (PEP)、0.2~0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PEP に、 $^3\text{H}$ -セロトニン ( $^3\text{H}$ -5-ヒドロキシトリプタミン ( $^3\text{H}$ -5HT)) ニュー・イングランド・ヌクレア製、26.5 Ci/mol, 1 m Ci/ml エタノール-水) を加え、37℃で 15 分間培養した。この決定では、シリコン化又はポリプロピレン試験管を用い、トロンビン を正のコントロールとして使用し、被覆したサンプル及び被覆しないサンプルをテストした。決定すべきサンプル含有の複製の管の各々に、1.0~2.0 ml の  $^3\text{H}$ -5HT-PEP を加えた。全放射能を測定するためコントロール混合物から 50  $\mu\text{g}$  の部分標品を採取した。適当な培養期間 (10~120 分) を経た後、懸濁液の 0.2~0.5 をとり、エベンドルフ・小型遠心分離機中の

シリコン船上で 12,000 XG で 10 分間遠心分離する。各管から 50  $\mu\text{g}$  の上澄液をとり、5 ml の液体シンチレーション液を加え、放射量をベータ-分光測定で測定した。トロンビン又はテストサンプルで放出された  $^3\text{H}$ -5HT の量は、上澄液の放射量の増加 (実験サンプルの放射量 - コントロールの放射量) である。テスト物質は、120 分まで  $^3\text{H}$ -5HT の顕著な血小板放出を誘因しなかつた。

代理人 弁護士 野 河 健 太 郎